



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

Marina Molina

**Comparação dos níveis cérvico-vaginais de elafina de
acordo com o status de infecção pelo HPV e presença de
vaginose bacteriana**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciências - área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Marconi

**Botucatu
2025**

Marina Molina

Comparação dos níveis cérvico-vaginais de elafina de acordo com o status de infecção pelo HPV e presença de vaginose bacteriana

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências - área Patologia.

Orientadora: Profa.Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Profa.Dra. Camila Marconi

Botucatu
2025

M722c Molina, Marina
Comparação dos níveis cérvico-vaginais de elafina de acordo com o status de infecção pelo HPV e presença de vaginose bacteriana / Marina Molina. -- Botucatu, 2025
50 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Camila Marconi

1. Papilomavírus Humano. 2. Microbiota. 3. Saúde da mulher. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARINA MOLINA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 27 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 9h30min, no(a) Anfiteatro Kunie labuki Rabello Coelho - Depto. de Patologia - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARINA MOLINA, intitulada **Comparação dos níveis cérvico-vaginais de elafina de acordo com o status de infecção pelo HPV e presença de vaginose bacteriana**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CAMILA MARCON (Co-orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Universidade Federal do Paraná (UFPR), Profa. Dra. MARIANA ALICE DE OLIVEIRA IGNÁCIO (Participação Virtual) do(a) Depto. de Enfermagem / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ALINE DO NASCIMENTO BOLPET (Participação Virtual) do(a) Universidade Nove de Julho (Uninove) / Bauru/SP. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. CAMILA MARCON

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA

Impacto científico: Este estudo investigou o papel da elafina frente à infecção por HPV de alto risco oncogênico e seu impacto na composição da microbiota vaginal, especialmente na vaginose bacteriana, ampliando conhecimentos acerca desse peptídeo como um potencial mediador na regulação da relação microbiota-HPV, além de incentivar maiores estudos acerca desse tema escasso na literatura.

Impacto Social: O câncer do colo de útero afeta milhares de mulheres todos os anos, sendo considerado o terceiro tipo de neoplasia mais incidente entre a população feminina. A relação HPV-microbiota ainda é pouco esclarecida na literatura, portanto, os achados dessa pesquisa contribuem com a elucidação dessa interação, visando a elafina como um possível mediador que pode, futuramente, auxiliar no esclarecimento do curso da infecção por HPV e seu impacto na microbiota vaginal, colaborando com a saúde ginecológica de milhares de mulheres.

Impacto econômico: Estudos acerca da ação do HPV e seu *clearance* viral contribuem para rastreios e diagnósticos mais assertivos quanto ao câncer de colo do útero, impactando significativamente questões de saúde pública e reduzindo custos com tratamento de infecções genitais e suas possíveis complicações no Sistema Único de Saúde (SUS).

Dedico este trabalho aos meus pais que, por diversas vezes, pouco entenderam sobre o que eu fazia aqui mas, em todo e qualquer momento, muito me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos pelas minhas raízes que, aguentando tempestades e rajadas de vento, fixadas ao chão, me permitiram voar e seguir esse e muitos outros sonhos. Pai, seu caráter e dedicação me ensinaram a perseverar. Mãe, sua força e seu amor me fizeram continuar sempre em frente.

À Deus e à espiritualidade, agradeço pelo maior e melhor presente que eu poderia ter: a vida.

Ao meu maior companheiro, Gabriel. Caminhar com você é a certeza de que a vista é boa, mas o caminho ao seu lado é ainda melhor. Essa trajetória não teria chegado ao fim com êxito sem você. Obrigada por tanto, meu amor.

Aos meus irmãos, por me ensinarem o que é me querer bem, mas querer outro alguém ainda melhor. A nossa parceria enriquece essa jornada.

À minha cachorrinha Mel. Não lhe ter mais aqui é uma das maiores dores que eu pude sentir, mas crescer ao seu lado foi um dos maiores amores que eu poderia experimentar.

Aos meus avós: Diogo, Gabriel, Júlia (*in memoriam*) e Maria. O esforço de uma costureira, uma lavadeira, um taxista e um frentista transformaram vidas e, hoje, a neta de vocês se torna Mestre.

Ao meu parceiro de jornada, Guilherme. Eu nunca duvidei de que encontraria bons amigos, mas em você encontrei mais do que isso. Dividir os dias com você ameniza as dores, intensifica as risadas e engrandece as conquistas. Obrigada, meu amigo.

À Giovana que, em pouco tempo, se fez mais que presente. Sua amizade é calma, cuidado e reciprocidade. Seu apoio foi primordial. Obrigada pelo que construímos juntas.

À todos os meus companheiros de laboratório. Por muito me questionei pelo tempo que demorei para chegar até aqui, hoje não me restam dúvidas. Que presente ter cruzado meu caminho com o de cada um de vocês, eu não mudaria nada. Jeniffer e Mariana, obrigada por serem suporte e referência para cada um de nós.

Agradeço aos meus sogros, Maristela e Jorge, por serem minha segunda família e por toda palavra de incentivo e apoio que me foi dirigida.

Agradeço à minha psicóloga Mayara. Muito disso se deve ao seu trabalho. Obrigada por estabelecer ordem no meu caos pessoal.

Às minhas orientadora e coorientadora, Márcia Guimarães da Silva e Camila Marconi. Sou muito grata pela oportunidade concedida e pela experiência enriquecedora que vivi no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal.

Agradeço aos colaboradores da UNIPEX e da FMB por todo empenho e dedicação em realizar um excelente trabalho.

Agradeço às mulheres que aceitaram participar desse projeto que, até hoje, rende tantos frutos. O apoio à pesquisa salva vidas e vocês colaboram com o avanço da ciência e da medicina. Viva o SUS!

Agradeço também à UNESP, à FMB e à UNISAGRADO, pela formação que me forneceram como biomédica e pesquisadora. Agradeço à CAPES pelo fomento à pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Por fim, mas não menos importante, agradeço a mim. Por acreditar na ciência e na educação, por ter seguido esse sonho e, hoje, estar conquistando mais um título, rumo à excelência.

Resumo

O Papilomavírus Humano (HPV) é considerado o agente etiológico de infecções sexualmente transmissíveis mais comum ao redor do mundo. Quando há uma infecção ativa por HPV, pode ou não haver alterações no colo do útero, com possível progressão para neoplasias. A presença isolada do HPV não é fator determinante para a tumorigênese. Este processo depende de diversos fatores, como presença de um genótipo de alto risco oncogênico (hrHPV), hábito tabagista, iniciação sexual precoce e composição da microbiota cervicovaginal que, em estado de eubiose, é caracterizada pelo predomínio do gênero *Lactobacillus* spp. A vaginose bacteriana (VB) é a disbiose vaginal mais comum em mulheres em idade reprodutiva, caracterizada pelo aumento de bactérias anaeróbias, como *Gardnerella* spp. Mulheres com VB apresentam menor taxa de *clearance* viral do HPV. Na presença de lesões com HPV, diversos peptídeos antimicrobianos sofrem alteração na sua produção e liberação. Em particular, a expressão do peptídeo Elafina/Trappin-2, um inibidor de serino-proteases, é significativamente menor quando na presença de infecção pelo HPV. Dessa forma, o objetivo deste estudo consiste em comparar os níveis cérvico-vaginais de elafina em mulheres em idade reprodutiva de acordo com o status da infecção pelo HPV, bem como determinar se a alteração desse mediador durante a infecção pelo HPV está associada à VB. O presente estudo analisou a quantificação de elafina de 626 amostras cérvico-vaginais por ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) de acordo com status de infecção por hrHPV e composição da microbiota vaginal. Os dados da quantificação foram comparados utilizando os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$ considerado significativo. Os valores de mediana de elafina foram significativamente mais altos em mulheres hrHPV-positivas com VB (1.390 pg/mL) em comparação àquelas com microbiota normal (1.079 pg/mL), $p < 0,0001$. No grupo de participantes hrHPV-negativas, mulheres com microbiota vaginal normal apresentaram níveis estatisticamente maiores de elafina (mediana 1.594 pg/mL) em relação àquelas com VB (904 pg/mL), $p < 0,0001$. Com relação à presença de infecção pelo hrHPV, independentemente da microbiota vaginal, os níveis de elafina não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo que não apresentava a infecção viral. **Concluindo**, níveis elevados de elafina na infecção por hrHPV concomitante à VB sugerem envolvimento na resposta imunológica local em resposta a alterações na microbiota.

Palavras-chave: HPV; Vaginose Bacteriana; Elafina.

Abstract

The Human Papillomavirus (HPV) is considered the most common etiological agent of sexually transmitted infections worldwide. When there is an active HPV infection, cervical alterations may or may not occur, with the potential progression to neoplasia. The mere presence of HPV is not a determining factor for tumorigenesis. This process depends on several factors, such as the presence of a high-risk oncogenic genotype (hrHPV), smoking habits, early sexual initiation, and the composition of the cervicovaginal microbiota, which, in a eubiotic state, is characterized by the predominance of the *Lactobacillus* spp. genus. Bacterial vaginosis (BV) is the most common vaginal dysbiosis in women of reproductive age, characterized by an increase in anaerobic bacteria, such as *Gardnerella* spp. Women with BV have a lower HPV viral clearance rate. In the presence of HPV-related lesions, various antimicrobial peptides undergo changes in their production and release. Specifically, the expression of Elafin/Trappin-2 peptide, a serine protease inhibitor, is significantly lower in the presence of HPV infection. Thus, the objective of this study is to compare cervicovaginal elafin levels in women of reproductive age according to their HPV infection status and to determine whether changes in this mediator during HPV infection are associated with BV. This study analyzed Elafin quantification in 626 cervicovaginal samples using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to hrHPV infection status and vaginal microbiota composition. Quantification data were compared using the non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, with $p < 0.05$ considered significant. Median elafin values were significantly higher in hrHPV-positive women with BV (1,390 pg/mL) compared to those with a normal microbiota (1,079 pg/mL), $p < 0.0001$. In hrHPV-negative group, women with a normal vaginal microbiota had statistically higher elafin levels (median 1,594 pg/mL) compared to those with BV (904 pg/mL), $p < 0.0001$. Regarding the presence of hrHPV infection, regardless of vaginal microbiota composition, elafin levels did not show a statistically significant difference when compared to the group without viral infection. In conclusion, elevated elafin levels in hrHPV infection concurrent with BV suggest involvement in the local immune response to microbiota alterations.

Keywords: HPV; Bacterial Vaginosis; Elafin.

Sumário

Capítulo 1 - Revisão de Literatura	11
1. Introdução.....	12
1.1 O Papilomavírus Humano (HPV).....	12
1.2 Câncer de colo do útero.....	13
1.3 Microbiota vaginal.....	15
1.4 Microbiota vaginal e infecção pelo HPV.....	17
REFERÊNCIAS.....	20
Capítulo 2 - Artigo Científico	27
1. Introdução.....	30
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivos específicos.....	31
3. Hipótese.....	31
4. Métodos.....	31
4.1. Desenho do estudo.....	31
4.2. Classificação microscópica da microbiota vaginal.....	32
4.3. Detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Trichomonas vaginalis</i>	33
4.4. Genotipagem de HPV.....	33
4.5. Exame citopatológico do colo do útero.....	34
4.6. Constituição dos grupos de estudo.....	34
4.7. Processamento das amostras cérvico-vaginais.....	35
4.8. Quantificação de proteínas totais cérvico-vaginais.....	35
4.9. Quantificação de Trappin/2-Elafina cérvico-vaginal.....	36
4.10 Análise estatística.....	36
5. Resultados.....	36
6. Discussão.....	42
7. Conclusão.....	45
8. Considerações finais.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

Capítulo 1

Revisão de literatura

1. Introdução

1.1. O Papilomavírus humano (HPV)

Os papilomavírus humanos (HPVs) são vírus pertencentes à família *Papillomaviridae* capazes de infectar pele e mucosas do corpo humano. O HPV é considerado o agente etiológico de infecções sexualmente transmissíveis (IST) mais comum ao redor do mundo e sua transmissão ocorre pelo contato direto pele com pele ou mucosa com mucosa. Tais infecções variam desde completamente assintomáticas até causadoras de verrugas, lesões pré-neoplásicas e neoplásicas^{1,2}.

Os HPV são vírus não envelopados, cujo genoma consiste em um DNA de fita dupla circular, com aproximadamente 7,9 kb e 55nm de diâmetro, composto por oito principais regiões codificadoras de proteínas essenciais, chamadas de ORFs (do inglês *open reading frames*). As regiões são agrupadas em três tipos, com base no momento em que são expressas durante a infecção. A região chamada URR (do inglês *upstream regulatory region*) é não codificadora, enquanto as regiões E (do inglês '*early*', precoce) e L (do inglês '*late*', tardio) representam as proteínas expressas em fases iniciais e finais, respectivamente - E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2³. As proteínas E1 e E2 são as principais envolvidas na regulação da replicação, transcrição e segregação do DNA viral⁴. E6 e E7 são as principais oncoproteínas do HPV, induzindo a imortalização e cooperando com a transformação celular, desempenhando papel importante na ativação das telomerasas e na degradação das proteínas p53 e pRb, ambas com papel importante na supressão tumoral, sendo que suas inibições ocasionam uma divisão celular descontrolada, colaborando com o desenvolvimento tumoral. A proteína E5 auxilia na diferenciação dos queratinócitos e na evasão imunológica, enquanto que as proteínas L1 e L2 têm função estrutural na formação icosaédrica do capsídeo⁵⁻⁶.

O HPV apresenta tropismo por células de epitélio escamoso, dessa forma seu ciclo viral se inicia a partir da interação mediada por receptores, como proteoglicanos e integrinas, na camada basal do epitélio escamoso estratificado por meio de microtraumas na região. O vírion entra na célula pela interação das proteínas do capsídeo, como a L2, com receptores da superfície celular por endocitose, onde inicialmente E1 e E2 assumem a replicação do DNA viral em um número baixo de cópias. Depois de penetrar na célula, o vírion perde o capsídeo,

expondo seu DNA à ação de enzimas nucleares que favorecem a expressão dos seus genes virais. Em seguida, quando as células basais assumem uma formação de epitélio suprabasal, a replicação viral se intensifica por meio da ação das oncoproteínas E5, E6 e E7. Com o alcance da diferenciação celular na camada suprabasal, inicia-se a expressão das proteínas E4, L1 e L2 para posterior formação de um capsídeo ao redor do vírus e liberação das partículas virais maduras, promovendo a infecção das células adjacentes (Figura 1)⁷⁻¹³.

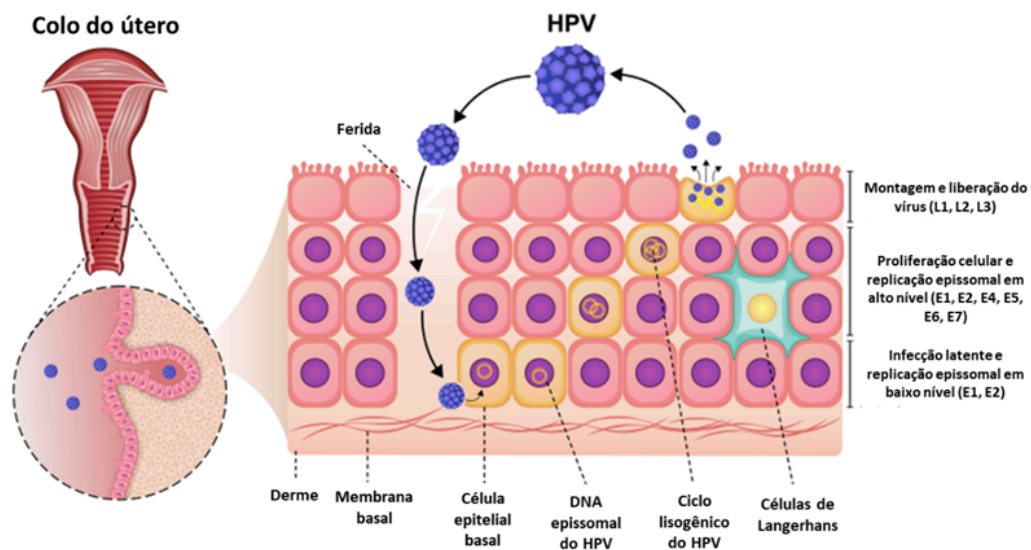


Figura 1: Esquema ilustrativo da infecção pelo HPV no colo do útero. A imagem mostra o ciclo de infecção, que inicia com a entrada do vírus na camada epitelial basal. O vírus infecta as células epiteliais e à medida que as células infectadas se proliferam e diferenciam, o vírus realiza sua replicação. Imagem adaptada de Yousefi et al., 2022.

1.2. Câncer de colo do útero

Mais de 90% dos casos de cânceres cervicais são causados pela infecção pelo HPV. Dentre os mais de 400 genótipos descritos na literatura, apenas 12 estão relacionados à carcinogênese (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59), sendo que o HPV16 e HPV18 são responsáveis por aproximadamente 71% dos casos de câncer cervical e praticamente todos os casos de câncer por HPV em homens. Embora infecções causadas por estes genótipos de alto risco oncogênico sejam extremamente comuns, cerca de 80% são solucionadas pelo sistema imunológico em até 3 anos, alcançando o *clearance*, enquanto apenas 3% progredem para o câncer cervical em até 7 anos¹⁵⁻¹⁷.

Os genótipos de alto risco oncogênico de HPVs estão evolutivamente ligados em um único ramo do gênero alfa. Dentro desse gênero, as espécies alfa-9, -7, -5 e -6 contêm os genótipos que caracterizam o HPV como de alto risco oncogênico, enquanto os de baixo risco oncogênico não estão associados ao aumento do risco de câncer cervical. O grupo de espécies alfa -9 apresenta vários genótipos associados à carcinogênese, como o HPV-16, 31, 33, 35, 52 e 58. O HPV-16 é o genótipo com maior potencial oncogênico, sendo responsável por 60% dos cânceres escamosos e adenocarcinomas cervicais, além de cânceres orofaríngeos e anogenitais. Já o grupo de espécies alfa -7 conta com os genótipos HPV-18 e o -45, associados tanto a cânceres escamosos quanto a adenocarcinomas e, juntos, causam aproximadamente 20% das neoplasias ¹⁸⁻²¹.

Quando há uma infecção ativa por HPV, pode ou não haver alterações no colo do útero, com possível progressão para lesões cancerígenas. O termo pré-câncer é definido como a mudança da replicação para um crescimento clonal das células transformadas, caracterizado pela ativação do ciclo viral a partir das oncoproteínas e pela inibição da apoptose natural da célula. Mesmo que haja o desenvolvimento de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL, do inglês, *low grade squamous intraepithelial lesions*), a maior parte das infecções desaparece em até 24 meses devido à ação do sistema imunológico do hospedeiro. No entanto, quando há persistência desse processo infeccioso nas células basais com uma baixa taxa de replicação viral, tem-se a chamada fase de latência, durante a qual, as células infectadas podem sofrer transformação neoplásica ao decorrer do tempo. As lesões são categorizadas em LSIL, que refletem apenas a presença do vírus, Lesão Intraepitelial escamosa de Alto Grau (HSIL, do inglês *high grade squamous intraepithelial lesions*) ou carcinoma *in situ*, sendo estas consideradas as lesões precursoras do câncer do colo do útero ^{20, 22-23}.

De acordo com estudo realizado pelo Ministério da Saúde (2020), a prevalência de HPV entre homens e mulheres no Brasil é de 53,6%. Desses, 35,2% apresentaram pelo menos um genótipo de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)⁴⁷. No Brasil, o câncer de colo de útero é o terceiro tipo de neoplasia mais incidente entre mulheres, excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Para cada ano do triênio 2023-2025 foram estimados 17.010 casos novos, o que representa uma taxa bruta de incidência de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres. Em 2022, 84% dos exames preventivos realizados para detecção do câncer de colo de útero foram realizados na população-alvo (25 a 64 anos)²⁴.

Estima-se que a maior parte da população feminina sexualmente ativa será infectada por algum genótipo do HPV ao decorrer da vida. Contudo, a presença isolada do HPV não é fator determinante para a tumorigênese. Este processo depende de diversos fatores que contribuem com o crescimento neoplásico, como a presença persistente de um genótipo de alto risco oncogênico, hábito tabagista, iniciação sexual precoce, uso de contraceptivo hormonal, número de paridades, resposta imunológica sistêmica e local e composição da microbiota cervicovaginal²⁵⁻²⁶.

1.3. Microbiota vaginal

O microbioma vaginal é caracterizado por uma comunidade bacteriana complexa e dinâmica, predominantemente constituído pelo gênero *Lactobacillus* spp. Esse microambiente é influenciado por diversos fatores como etnia, ciclo menstrual, níveis hormonais, práticas sexuais e ambientais em geral²⁷⁻²⁹.

A predominância de *Lactobacillus* spp. favorece a homeostase do microambiente vaginal, pois essas espécies são as principais produtoras de ácido láctico a partir do glicogênio disponibilizado pelas células epiteliais. Em cenário fisiológico, a presença do ácido láctico acidifica o pH vaginal, além de contribuir para o aumento da atividade protetora do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e bacteriocinas, criando um ambiente desfavorável para a infecção de patógenos, dentre eles, os causadores de endocervicites bacterianas clássicas como *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*³⁰⁻³². Além disso, a acidez saudável do microambiente vaginal (pH~4) se correlaciona com a diminuição de risco de tricomoníase e infecção genital por *Mycoplasma* spp. na região genital⁴⁸, infecções do trato urinário⁴⁹, bem como a diminuição do transporte de bactérias do intróito vaginal⁵⁰.

As comunidades bacterianas vaginais de mulheres em idade reprodutiva podem variar entre indivíduos de diferentes regiões e etnias. Ravel et al. (2011)²⁷ demonstraram a prevalência de *Lactobacillus* spp. em mulheres asiáticas e brancas americanas, enquanto apenas 60% das mulheres hispânicas e afro-americanas apresentavam essa dominância. Achados de Fettweis et al. (2014)³³, demonstram a prevalência de *Lactobacillus* em mulheres com ascendência europeia, enquanto mulheres afro-americanas apresentavam maior diversidade bacteriana contendo, entre outros, *Mycoplasma hominis*, *Aerococcus*, *L. iners* e outras espécies anaeróbias.

Em 2011, Ravel et al.²⁷ categorizaram o microambiente vaginal em cinco tipos de estado de comunidade (CST, do inglês *community state types*), sendo CST-I predominantemente constituída por *L. crispatus*, enquanto as CSTs II, III e V apresentam predominância de *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, respectivamente. Já a CST IV apresentou a maior diversidade bacteriana, além de maior média dos valores de pH, tendo altas proporções de bactérias anaeróbias restritas e facultativas, como as dos gêneros *Prevotella*, *Dialister*, *Fannyhessea*, *Gardnerella*, *Mobiluncus*, entre outras. Além disso, na CST-IV encontram-se a maior parte dos casos de mulheres com sintomas genitais como corrimento vaginal aumentado com mau cheiro, típicos da vaginose bacteriana (VB).

A VB é a disbiose vaginal mais comum em mulheres em idade reprodutiva e está associada ao aumento da susceptibilidade a ISTs, infecções urogenitais, doença inflamatória pélvica e complicações durante a gestação³⁴. É um desequilíbrio no qual ocorre a substituição de *Lactobacillus* spp. por uma grande diversidade de outras espécies, como *Gardnerella* spp.. Sua etiologia ainda é desconhecida, mas é possível correlacionar a presença de VB com hábitos comportamentais e sexuais³⁵, como etnia, tabagismo⁵¹, variabilidade de parceiros sexuais e episódios mais frequentes de sexo oral receptivo⁵².

Os critérios descritos por Amsel et al. (1983)³² conferem sinais e sintomas clínicos que se relacionam com a VB e, quando há pontuação de 3 dos 4 tópicos, há indicação para o diagnóstico. Esses critérios incluem: corrimento vaginal com aspecto bolhoso, branco ou acinzentado, pH vaginal acima de 4,5, presença de células-pista (*clue cells*) e positividade no teste das aminas (*whiff-test*), com presença de odor de peixe após adição de hidróxido de potássio a 10% ao conteúdo vaginal³⁶.

No entanto, o padrão-ouro para diagnóstico da VB é o sistema de atribuição de escores descritos por Nugent et al. (1991)³⁷, baseado na semi-quantificação dos morfotipos bacterianos observados microscopicamente em esfregaços vaginais corados pelo método de Gram. Nesse sistema foi proposto uma classificação da microbiota vaginal com escores que variam de 0 a 10. Os principais morfotipos considerados são os bacilos longos Gram-positivos (morfotipo lactobacilar), cocobacilos Gram-variáveis (sugestivos de *Gardnerella vaginalis*), bacilos curtos Gram-negativos (sugestivos de *Bacteroides* spp.) e bacilos curvos Gram-variáveis (morfotipos de *Mobiluncus* spp.). A semi-quantificação da presença ou ausência desses morfotipos resulta na pontuação final, sendo que o escore de 0 a 3 indica

diagnóstico de microbiota normal, enquanto as somatórias de 4 a 6 e de 7 a 10 caracterizam microbiota intermediária e vaginose bacteriana (VB), respectivamente.

1.4. Microbiota vaginal e infecção pelo HPV

A constituição da microbiota vaginal é um fator determinante na infecção pelo HPV, visto que mulheres com VB apresentam menor taxa de *clearance* viral enquanto mulheres com predomínio de *Lactobacillus* spp. estão menos propensas à aquisição de infecções virais^{38,39}. Achados de Belletti et al. (2021)⁴⁰ apontam a influência negativa da presença de *Gardnerella vaginalis* (GV), bactéria descrita no *core* patológico da VB, no *clearance* de infecções por genótipos de HPV de alto risco oncogênico, além da possível associação entre espécies produtoras de sialidase, como a *G. vaginalis*, na persistência da infecção viral (Figura 2). As sialidases são enzimas responsáveis pela hidrólise do ácido siálico das células epiteliais hospedeiras, expondo receptores que facilitam a adesão bacteriana e corroboram com a formação de biofilmes, estruturas que já foram associadas com a ocorrência de tratamentos ineficazes contra vaginose bacteriana^{53,54}.

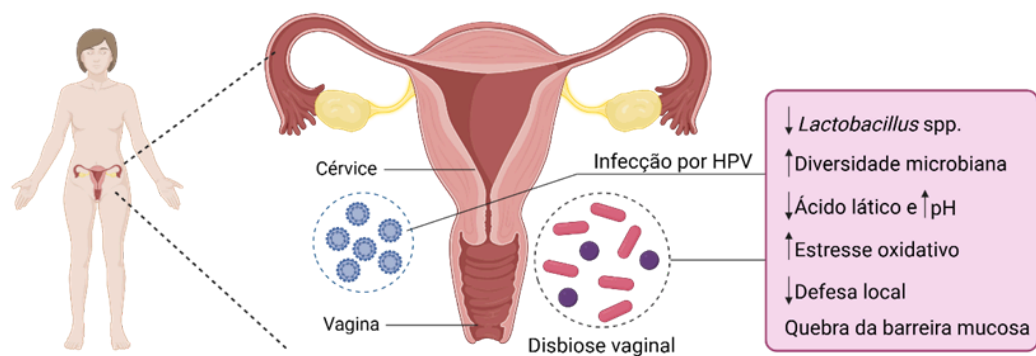


Figura 2. Representação da interação entre o microbioma vaginal e o HPV no ambiente do trato reprodutor feminino. A redução de *Lactobacillus* spp. e o aumento da diversidade microbiana alteram o pH vaginal e reduzem os níveis de ácido láctico, favorecendo o estresse oxidativo e a quebra da barreira mucosa. Esses fatores enfraquecem a defesa local e facilitam a persistência e progressão da infecção por HPV, aumentando o risco de desenvolvimento de lesões pré-cancerígenas e câncer cervical. Imagem adaptada de ZHANG, et al. 2024.

Estudo recente de Lebeau et al. (2022)⁴¹, demonstrou que a infecção pelo HPV também predispõe ao desenvolvimento da VB. Isso se dá pela alteração dos produtos secretados na mucosa cérvico-vaginal. Especificamente, a diminuição da produção e liberação de peptídeos de defesa em resposta à interação entre a oncoproteína E7 com proteínas-chave (NEMO, CK1), tem se mostrado fundamental nesse processo. Constatou-se ainda que as moléculas mais secretadas pela mucosa cervical não apresentam nenhuma atividade antimicrobiana nos *Lactobacillus*, ao invés disso, são clivadas e usadas como aminoácidos para sustentar o crescimento e a sobrevivência de tais bactérias.

Na presença de lesões com HPV, diversos peptídeos antimicrobianos, como as defensinas, sofrem queda na sua produção e liberação. A inibição das defensinas, especialmente as nomeadas elafina e S100A7, estão associadas ao desenvolvimento de infecção pelo HPV já que em condições normais/sem infecção, estes foram até 1000x mais expressos⁴¹. O peptídeo elafina, também chamado de Human Trappin/2, é produzido pelo gene *PI3* e considerado um inibidor endógeno de serina protease. Essa proteína é secretada em superfícies de mucosa e, quando expressa em tecidos, costuma indicar a presença de uma resposta inflamatória além de ter sua atividade relacionada com resolução de processos inflamatórios e preservação de integridade tecidual^{44,45,55}.

Longatto-Filho, et al. (2020)⁴² constataram, por meio de imunohistoquímica em amostras de tecido com câncer cervical, que há uma relação inversamente proporcional entre a expressão da elafina e a progressão tumoral. A alta expressão desse peptídeo foi mais frequente em carcinomas *in situ* quando comparados às neoplasias cervicais invasivas, indicando que a queda da elafina na membrana plasmática está associada a tumores mais agressivos. Em contrapartida, também relataram que a alta expressão do peptídeo no núcleo ou no citoplasma foi associada a estágios avançados de câncer cervical. Além disso, puderam observar a regulação negativa da elafina como um fator relevante na patogênese do HPV.

Embora já tenha sido demonstrado que a VB está associada ao aumento de prevalência e persistência da infecção pelos HPVs de alto risco oncogênico, dados recentes demonstraram que essa infecção viral também é responsável por alterar o ambiente cérvico-vaginal, predispondo à quebra do equilíbrio microbiano via diminuição de elafina e desenvolvimento de VB⁴¹. Considerando as graves implicações da VB para a saúde reprodutiva da mulher, somado à ausência de informações na literatura sobre o impacto da diminuição desse peptídeo durante a infecção pelo HPV na microbiota local, estudos são necessários entender o papel da

elafina frente à infecção pelo HPV e seu impacto na modulação da composição da microbiota cérvico-vaginal.

REFERÊNCIAS

1. BERNARD, Hu. et al. **Classification of papillomavirus based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.** *Virology*, 2010. 401(1):70-9. Disponível em: doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002
2. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **HPV.** Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/aceso-a-informacao/perguntas-frequentes/hpv>
3. YU, L. et al. **HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation.** *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23(9), 4943. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23094943>
4. CRICCA, M. et al. **Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions.** *Journal of Virological Methods*, 2009. 158(1-2),180–183. Disponível em: doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.005
5. BUCK, C.B.; DAY, P.M.; TRUS, B.L. **The papillomavirus major capsid protein L1.** *Virology*, 2013. 445(1-2): 169–174. Disponível em: DOI:10.1016/j.virol.2013.05.038.5.
6. PAL, A.; KUNDU, R. **Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy.** *Front. Microbiol*, 2020. 10:3116. Disponível em: doi: 10.3389/fmicb.2019.03116
7. WANG, J.W.; RODEN, R.B. **L2, the minor capsid protein of papillomavirus.** *Virology*, 2013. 445(1-2):175-86. Disponível em: doi: 10.1016/j.virol.2013.04.017.
8. DIGIUSEPPE, S.; BIENKOWSKA-HABA, M.; SAPP, M. **Human Papillomavirus Entry: Hiding in a Bubble.** *J. Virol*, 2016. 90, 8032–8035. Disponível em: doi: 10.1128/JVI.01065-16
9. EVANDER, M.; et al. **Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses.** *J. Virol.* 1997, 71, 2449–2456. Disponível em: doi: 10.1128/JVI.71.3.2449-2456.1997
10. JOYCE, J.G., et al. **The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface**

glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem*, 1999. 274, 5810–5822. Disponível em: doi: 10.1074/jbc.274.9.5810.

11. MUNGER, K.; HOWLEY, P.M. **Human papillomavirus immortalization and transformation functions.** *Virus Res*, 2002. 89, 213–228. Disponível em: doi: 10.1016/s0168-1702(02)00190-9.

12. ROMAN, A.; MUNGER, K. **The papillomavirus E7 proteins.** *Virology*, 2013. 445, 138–168. Disponível em: doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013. Epub 2013 May 31.

13. VANDE, S.B.P.; KLINGELHUTZ A.J. **Papillomavirus E6 oncoproteins.** *Virology*, 2013. 445, 115–137. Disponível em: doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026

14. YOUSEFI, A.H.Z. **An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy.** *Front Immunol*, 2022. 12:805695. Disponível em: doi: 10.3389/fimmu.2021.805695.

15. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Fatores de Risco: Informações sobre os fatores de risco para Câncer do Colo do Útero.** Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/fatores-de-risco>

16. DEMARCO, M., et al. **A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs.** *eClinicalMedicine*, 2020. 22:100293. Disponível em: DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100293

17. SANJOSE, S., et al. **Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study.** *Lancet Oncol*, 2010. 11(11):1048-56. Disponível em: doi: 10.1016/S1470-2045(10)70230-8

18. GUAN, P., et al. **Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: ameta-analysis from cervical infection to cancer.** *Int J Cancer*, 2012. 131(10):2349-2359. Disponível em: doi: 10.1002/ijc.27485

19. World Health Organization. **Cervical Cancer Screening.** IARC Handbooks of Cancer Prevention, 2022. Vol 18. IARC Publications. Disponível em:

<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Handbooks-Of-Cancer-Prevention/Cervical-Cancer-Screening-2022>

20. SCHIFFMAN, M. et al. **Human papillomavirus and cervical cancer**. Lancet, 2007. 370(9590):890-907. Disponível em: doi:10.1016/S0140-6736(07)61416-0

21. DE MARTEL, C., et al. **Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type**. Int J Cancer, 2017. 141(4):664-670. Disponível em: doi:10.1002/ijc.30716

22. HAMMER, A., et al. **A study of the risks of CIN3+ detection after multiple rounds of HPV testing: Results of the 15-year cervical cancer screening experience at Kaiser Permanente Northern California**. Int J Cancer, 2020. 147(6):1612-1620. Disponível em: doi: 10.1002/ijc.32950

23. American Cancer Society. Cervix Cancer Statistics. 2018. Disponível em: <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/types/cervix>

24. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/numeros/estimativa>

25. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Fatores de Risco - Informações sobre os fatores de risco para Câncer do Colo do Útero**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-uterio/fatores-de-risco>

26. INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. **Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies**. Int J Cancer, 2006. 119(5):1108-24. Disponível em: doi: 10.1002/ijc.21953.

27. RAVEL, J., et al. **Vaginal microbiome of reproductive-age women**. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108 Suppl 1(Suppl 1):4680-7. Disponível em: doi: 10.1073/pnas.1002611107.

28. MARCONI, C. et al. **Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in southeastern Brazil.** *Int J Gynaecol Obstet*, 2015. 131(2): 137-41. Disponível em: doi: 10.1016/j.ijgo.2015.05.016.
29. LEWIS, F.M.T.; BERNSTEIN, K.T.; ARAL, S.O. **Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases.** *Obstet Gynecol*, 2017. 129: 643–54. Disponível em: doi: 10.1097/AOG.0000000000001932.
30. WIESENFELD, H. C., et al. **Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection.** *Clin. Infect. Dis.*, 2003. 36, 663–668. Disponível em: doi: 10.1086/367658.
31. BOSKEY, E.R., et al. **Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification.** *Infect Immun*, 1999. 67: 5170-5. 7. Disponível em: doi: 10.1128/IAI.67.10.5170-5175.
32. AMSEL, R. et al. **Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations.** *Am J Med*, 1983. 74: 14-22. Disponível em: doi: 10.1016/0002-9343(83)91112-9.
33. FETTWEIS, J.M. et al. **Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry.** *Microbiology (Reading)*, 2014. 160(Pt 10):2272-2282. Disponível em: doi: 10.1099/mic.0.081034-0
34. RAVEL, J. et al. **Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis.** *Microbiome*, 2013. 1(1):29. Disponível em: doi: 10.1186/2049-2618-1-29.
35. KOUMANS, E.H. et al. **The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health.** *Sex Transm Dis*, 2007. 34: 864-9. Disponível em: doi: 10.1097/OLQ.0b013e318074e565
36. DONDERS, G.G.G. **Definition and classification of abnormal vaginal flora.** *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2007. 21:355-73. Disponível em: doi: 10.1016/j.bpobgyn.2007.01.002

37. NUGENT, R.P; KROHN, M.A; HILLIER, S.L. **Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation.** J Clin Microbiol, 1991. 29:297-301. Disponível em: doi: 10.1128/jcm.29.2.297-301.1991.
38. KING, CC. et al. **Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus.** Infect Dis Obstet Gynecol, 2011. 2011: 319460. Disponível em: doi: 10.1155/2011/319460
39. GILLET, E. et al. **Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis.** BMC Infect Dis, 2011. 11: 10. Disponível em: doi: 10.1186/1471-2334-11-10.
40. BELLETI, R. et al. **Cervicovaginal loads of Gardnerella spp. are increased in immunocompetent women with persistent high-risk human papillomavirus infection.** Journal of Medical Microbiology, 2022. 71:001527. Disponível em: DOI 10.1099/jmm.0.001527
41. LEBEAU, A. et al. **HPV infection alters vaginal microbiome through down-regulating host mucosal innate peptides used by *Lactobacilli* as amino acid sources.** Nature Communications, 2022. 13: 1076. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28724-8>
42. LONGATTO-FILHO, A., et al. **Evaluation of Elafin Immunohistochemical Expression as Marker of Cervical Cancer Severity.** Acta Cytologica, 2021. 65: 165-174. Disponível em: doi:10.1159/000512010
43. VERRIER, T. et al. **The WAP protein trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses.** Int J Biochem Cell Biol, 2012. 44: 1377. Disponível em: doi: 10.1016/j.biocel.2012.05.007.
44. PFUNDT, R. et al. **Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia.** J Clin Invest, 1996. 98(6): 1389. Disponível em: doi: 10.1172/JCI118926.
45. DOUCET, A. et al. **Characterization of human pre-elafin mutants: full antipeptidase activity is essential to preserve lung tissue integrity in experimental emphysema.** Biochem J, 2007. 405(3): 455. Disponível em: doi: 10.1042/BJ20070020.

46. ZHANG, Z. et al. **Human papillomavirus and cervical cancer in the microbial world: exploring the vaginal microecology.** Front Cell Infect Microbiol, 2024. 14:1325500. Disponível em: doi: 10.3389/fcimb.2024.1325500.
47. **Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-BRASIL) - 2015-2017** / Associação Hospitalar Moinhos de Vento. – Porto Alegre, 2020. Disponível em: <https://antigo.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/estudo-epidemiologico-sobre-prevalencia-nacional-de-infeccao-pelo-papilomavirus-humano-0>
48. HANNA, N. F. et al. **The relation between vaginal pH and the microbiological status in vaginitis.** Br J Obstet Gynaecol, 1985. 92(12):1267-71. Disponível em: doi: 10.1111/j.1471-0528.1985.tb04874.x.
49. STAMEY, T. A.; KAUFMAN, M. F. **Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. II. A comparison of growth in normal vaginal fluid of common versus uncommon serogroups of *Escherichia coli*.** J. Urol, 1975. 114(2):264–7. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)67004-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)67004-6)
50. STAMEY, T. A.; TIMOTHY, M. M. **Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. I. The role of vaginal pH.** J. Urol. ;114(2):261–3. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)67003-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)67003-4)
51. KOUMANS, E. H. et al. **The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health.** Sex Transm Dis, 2007. 34(11):864-9. Disponível em: doi: 10.1097/OLQ.0b013e318074e565.
52. SCHWEBKE, J. R.; RICHEY, C. M.; WEISS, H. L. **Correlation of behaviors with microbiological changes in vaginal flora.** J Infect Dis, 1999. 180(5):1632-6. Disponível em: doi: 10.1086/315065.
53. VARKI, A.; GAGNEUX, P. **Multifarious roles of sialic acids in immunity.** Ann N Y Acad Sci, 2012. 1253(1):16–36. Disponível em: doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x

54. SWIDSINSKI, A. et al. **Adherent Biofilms in Bacterial Vaginosis**. *Obstetrics & Gynecology*, 2005. 106(5,1):1013-1023. Disponível em: DOI: 10.1097/01.AOG.0000183594.45524.d2

55. GUYOT, N. et al. **Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis**. *J. Biol. Chem*, 2008. 283, 32377–32385. Disponível em: DOI 10.1074/jbc.M803707200

Capítulo 2

Artigo Científico

Journal of Lower Genital Tract Disease

Comparação dos níveis cérvico-vaginais de elafina de acordo com o status de infecção pelo HPV e presença de vaginose bacteriana

Marina Molina¹, Jeniffer Sena Baptista Ferreira¹, Guilherme Nastaro¹, Mariana de Castro Silva¹, Giovana Fernanda Cosi Bento¹, Márcia Guimarães da Silva¹, Camila Marconi²

¹UNESP – Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, São Paulo, Brasil.

²UFPR - Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, Paraná, Brasil.

Resumo

Objetivos: Este estudo comparou os níveis cérvico-vaginais de elafina em mulheres em idade reprodutiva com base no status de hrHPV e da vaginose bacteriana (VB). **Métodos:** Este estudo transversal analisou 626 amostras cérvico-vaginais de uma coorte de mulheres com idades entre 18 e 50 anos. O status de HPV foi determinado utilizando o teste de Genotipagem Linear Array HPV, enquanto o diagnóstico de VB foi baseado nos critérios de Nugent. Os níveis de elafina foram quantificados usando o por ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Os níveis de elafina foram comparados entre grupos constituídos de acordo com o status da infecção por hrHPV e da presença de VB, utilizando os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$ considerado significativo. **Resultados:** Os níveis de elafina foram significativamente mais altos em mulheres hrHPV-positivas com VB (1.390 pg/mL) em comparação com participantes hrHPV-positivas e microbiota normal (1.079 pg/mL), $p < 0,0001$. No grupo de participantes hrHPV-negativas, mulheres com microbiota vaginal normal apresentaram níveis estatisticamente maiores de elafina (1.594 pg/mL) em relação àquelas com VB (904 pg/mL), $p < 0,0001$. Com relação à presença de infecção pelo hrHPV, independentemente do diagnóstico da microbiota vaginal, os níveis de elafina não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), com mediana de 1.164 pg/mL, quando comparado ao grupo que não apresentava a infecção viral

(1.169 pg/mL). **Conclusão:** Níveis elevados de elafina na infecção por hrHPV concomitante à VB sugerem envolvimento na resposta imunológica local em resposta a alterações na microbiota. Estudos adicionais são necessários para esclarecer seu papel na persistência do HPV e na patogênese da VB.

Palavras-chave: HPV; hrHPV; Microbiota vaginal; Vaginose Bacteriana; Elafina; Trappin/2.

1. Introdução

O HPV é considerado o agente etiológico de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comum ao redor do mundo. Tais infecções variam desde completamente assintomáticas até neoplásicas^{1,2}. HPVs de alto risco oncogênico (hrHPV) estão associados ao desenvolvimento de câncer de colo de útero. Entretanto, apenas a infecção por hrHPV não é fator determinante para a tumorigênese. Este processo depende de diversos fatores, como a infecção persistente por hrHPV, hábito tabagista, iniciação sexual precoce, uso de contraceptivo hormonal, resposta imunológica e composição da microbiota vaginal^{3,4}.

A microbiota vaginal normal é caracterizada por uma comunidade bacteriana predominantemente constituída por espécies do gênero *Lactobacillus*. A alteração desse perfil para um predomínio de bactérias anaeróbias caracteriza a vaginose bacteriana (VB), considerada a disbiose vaginal mais comum em mulheres em idade reprodutiva, descrita por uma grande diversidade de outras espécies, como *Gardnerella* spp, *Fannyhessea vaginae*, *Mobiluncus* spp e *Prevotella* spp⁵⁻⁸.

A constituição da microbiota vaginal é um fator associado à infecção pelo HPV, visto que mulheres com VB apresentam menor taxa de *clearance* viral enquanto mulheres com predomínio de *Lactobacillus* spp. estão menos propensas à aquisição de infecções virais^{9,10}. Achados de Belletti et al., (2021)¹¹ apontam a influência negativa da maior quantidade de *Gardnerella vaginalis* cérvico-vaginal para o *clearance* de infecções por hrHPV.

Apesar da presença da VB levar ao aumento da suscetibilidade e persistência de HPV, estudo de Lebeau et al. (2022)¹², demonstrou que a infecção pelo HPV também predispõe ao desenvolvimento da VB. Na presença de lesões com HPV, diversos peptídeos antimicrobianos, como as defensinas, sofrem queda na sua produção e liberação. A inibição das defensinas cérvico-vaginais, especialmente a elafina, está associada ao desenvolvimento de infecção pelo HPV.

Embora já tenha sido demonstrado que a VB está associada ao aumento de prevalência e persistência da infecção pelos hrHPVs, dados recentes demonstraram tal infecção viral também é responsável por alterar o ambiente cérvico-vaginal, predispondo à quebra do equilíbrio microbiano via diminuição de elafina e desenvolvimento de VB. Considerando as graves implicações da VB para a saúde reprodutiva da mulher, somado à ausência de informações na literatura sobre o impacto da diminuição desses peptídeos durante a infecção

pelo HPV na microbiota local, a realização de estudos é fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos na relação HPV-microbiota.

2. Objetivos

Comparar os níveis cérvico-vaginais de elafina em mulheres em idade reprodutiva de acordo com o status da infecção pelo hrHPV, bem como determinar se a concentração desse mediador durante tal infecção viral está associada com a prevalência e incidência de vaginose bacteriana.

2.1. Objetivos específicos

- Comparar os níveis cérvico-vaginais de elafina de acordo com o status da infecção pelo HPV;
- Comparar os níveis cérvico-vaginais de elafina de acordo com a presença de VB;
- Determinar se os níveis cérvico-vaginais de elafina estão associados ao *clearance* da infecção pelo HPV;
- Determinar se os níveis cérvico-vaginais de elafina estão associados à incidência de VB;

3. Hipótese

A menor concentração cérvico-vaginal de elafina durante a infecção pelo HPV está associada à prevalência e incidência de VB.

4. Métodos

4.1. Desenho do estudo

Trata-se de estudo transversal, cuja população foi composta pelas mulheres em idade reprodutiva pertencentes à coorte “HPV-CT” que fazem parte do projeto “Prevalência de coinfeção e fatores associados ao papilomavírus humano (HPV) e à *Chlamydia trachomatis* em mulheres em idade reprodutiva atendidas em Programa de Prevenção de Câncer do Colo Uterino na região Sudeste do Brasil” que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP (Parecer nr. 1.909.609) juntamente com a aprovação do presente estudo (Parecer nr. 6.259.511), conforme anexo A.

Para constituição da coorte “HPV-CT” foram incluídas 1635 mulheres que, voluntariamente procuraram as unidades básicas de saúde do município de Botucatu, SP, Brasil, para realização do exame preventivo de câncer de colo uterino. Os critérios para inclusão foram: idade entre 18 e 50 anos, períodos menstruais mensais regulares, não gestantes, ausência de soroconversão para o HIV, imunossuprimidas, ausência de tratamento de infecções do trato genital inferior no período de 30 dias e mínimo de 72 horas de abstinência sexual ou de procedimentos vaginais (toque digital, ultrassom vaginal). As participantes foram submetidas à coleta de material do terço médio da parede vaginal para confecção de esfregaços vaginais para avaliação microscópica da microbiota vaginal para detecção de VB. Amostras endocervicais foram obtidas por *cytobrush* para a pesquisa e genotipagem de HPV. Foi realizada coleta de espécime de fundo de saco vaginal e ectocérvice com espátula de Ayre e do endocérvice com *cytobrush*, para citologia oncótica tríplice. Finalmente, foram realizados lavados cérvico-vaginais utilizando 3 mL de solução salina estéril para quantificação proteica que foram armazenadas a -80°C até o processamento. Aquelas que apresentaram resultado positivo para hrHPV no momento da inclusão no estudo foram submetidas a *follow up* após, em média, 12 meses. Das 545 (33,3%) participantes com resultado positivo para hrHPV, 344 compareceram à visita de *follow up* e foram submetidas à nova coleta de amostras cérvico-vaginais. Foram excluídas as participantes com resultado positivo para *Trichomonas vaginalis* e aquelas que apresentavam quantidade de material insuficiente para análise.

4.2. Classificação microscópica da microbiota vaginal

As lâminas contendo amostras de esfregaço de parede vaginal foram utilizadas para classificação da microbiota vaginal em exame microscópico corado pelo método de Gram, aplicando os critérios de Nugent et al. (1991).

Conforme tal sistema, a classificação da microbiota vaginal foi pontuada em escores que variam de 0 a 10, sendo que os escores de 0 a 3 indicam presença de microbiota normal, enquanto as somatórias de 4 a 6 e de 7 a 10 caracterizam microbiota intermediária e VB, respectivamente.

4.3. Detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*

A detecção de *T. vaginalis* foi realizada por cultura do material vaginal em meio de Diamond. Foram consideradas positivas as culturas em que houve a detecção da presença de trofozoítos por microscopia em até 72 h. Além disso, amostras cervicais foram submetidas à extração de DNA usando o kit AmpliLuteLiquid Media Extraction (Roche Molecular Systems, Inc) e foram testadas para *C. trachomatis* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), empregando-se os primers CTP1 (5'-TAG TAA CTG CCA CTT CAT CA-3') e CTP2 (5'-TTC CCC TTG TAA TTC GTT GC-3') para um produto final de 201 pb, utilizando protocolo de amplificação já padronizado no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), FMB, Unesp. Em todas as reações foram incluídos controles negativo (água) e positivo (DNA plasmidial obtido de células McCoy infectadas). Para detecção do microrganismo através da visualização dos produtos amplificados, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corada com intercalante de DNA. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 pb e visualizado sob transiluminação ultravioleta²¹.

4.4. Genotipagem de HPV

As amostras de DNA cervical também foram utilizadas para pesquisa de *C. trachomatis* foram utilizadas para detecção e genotipagem de HPV utilizando o kit Linear Array HPV genotyping test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA), conforme instruções do fabricante.

Brevemente, essa metodologia se baseia na amplificação de uma região do gene L1 com posterior e hibridização com sondas oligonucleotídicas, mobilizadas em tira de genotipagem. Na presença de hibridização com qualquer uma das 37 sondas (diferentes genótipos de HPV), uma reação colorimétrica permite a detecção por um ou mais genótipos de HPV presentes, sendo considerados genótipos de alto risco oncogênico: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82.

4.5. Exame citopatológico do colo do útero

Para análise da citologia cérvico-vaginal convencional foi empregada a coloração de Papanicolau e os resultados seguindo a classificação do Sistema Bethesda⁷³. A avaliação citológica foi realizada no Laboratório de Citologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, seguindo a rotina da Atenção Básica do Município de Botucatu.

4.6. Constituição dos grupos de estudo

A constituição dos grupos de estudo se baseou no status do hrHPV e na presença de VB na classificação de microbiota vaginal, conforme descrito na Figura 1.

Das 1638 amostras do projeto inicial, 3 apresentaram quantidade de material insuficiente para análise. Em seguida, 413 amostras diagnosticadas com hrHPV e 1095 amostras que não apresentaram a infecção foram subdivididas de acordo com a classificação de microbiota a partir de análise microscópica.

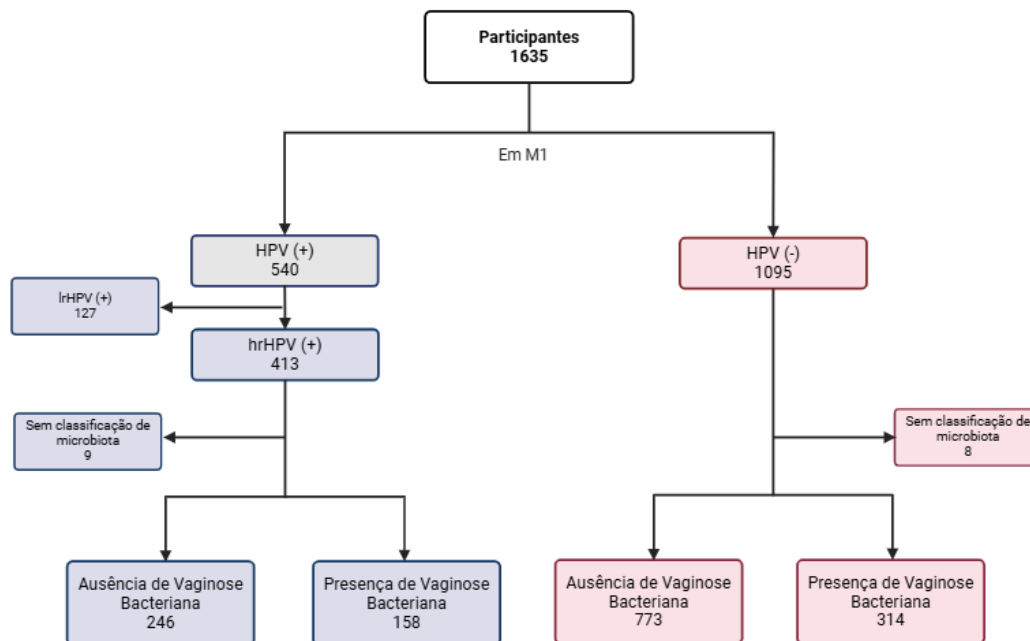


Figura 1. Fluxograma representando a coorte de participantes incluídas no estudo, classificadas quanto à presença de infecção por HPV e diagnóstico de vaginose bacteriana. Foram destacadas também as subcategorias relacionadas à classificação de microbiota vaginal e à identificação de HPV de alto risco (hrHPV). As participantes lrHPV não foram incluídas nas análises. (M1: momento 1 da coorte; lrHPV: HPV de baixo risco oncogênico).

4.7. Processamento das amostras cérvico-vaginais

As amostras de lavado cérvico-vaginal das participantes encontravam-se armazenadas a -80° C. As amostras selecionadas foram descongeladas em temperatura ambiente e imediatamente vortexadas para homogeneização do material. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes utilizados para os ensaios imunoenzimáticos. Deve-se ressaltar que as amostras foram processadas em lotes e que cada lote foi submetido aos ensaios no mesmo dia do descongelamento.

4.8. Quantificação de proteínas totais cérvico-vaginais

Após o processamento, as amostras de lavado cérvico-vaginal foram submetidas à quantificação de proteínas totais por de Bradford Reagent (B6916, Sigma, St. Louis, MO, USA). Para a curva padrão do ensaio, foi empregado o produto Protein Standard II (5000007,

Bio-Rad, Hercules, California, USA). Os ensaios foram realizados em simplicata seguindo as orientações do fabricante. Foram determinados os níveis mínimos e máximos para cada ensaio em um intervalo de 1,48mg/ml a 0,1mg/ml.

4.9. Quantificação de Trappin-2/Elafina cérvico-vaginal

Após quantificação de proteínas totais, as amostras de lavado cérvico-vaginal foram submetidas à quantificação de elafina utilizando ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA). Para tanto, foi empregado o kit comercial Human Trappin-2/Elafin DuoSet ELISA da R&D Systems (Minneapolis, MN). Os ensaios foram realizados em simplicata seguindo as orientações do fabricante. Foram determinados os níveis mínimos e máximos para cada ensaio de acordo com a curva-padrão fornecida nos kits.

4.10. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® (versão 9.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição dos dados. Após verificação da normalidade, os resultados obtidos da quantificação de elafina foram submetidos à análise de estatísticas descritivas. Os níveis de elafina foram comparados entre grupos, em relação ao status da microbiota vaginal e presença de hrHPV, por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Em seguida, as amostras com presença de hrHPV que apresentaram *follow-up* no estudo foram submetidas a análises de acordo com desfecho do hrHPV, evolução da composição da microbiota vaginal e presença de lesão em M1, por testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

5. Resultados

As 626 participantes do estudo foram subdivididas em grupos de acordo com status da infecção pelo hrHPV e classificação da microbiota vaginal. Do total de 413 participantes com

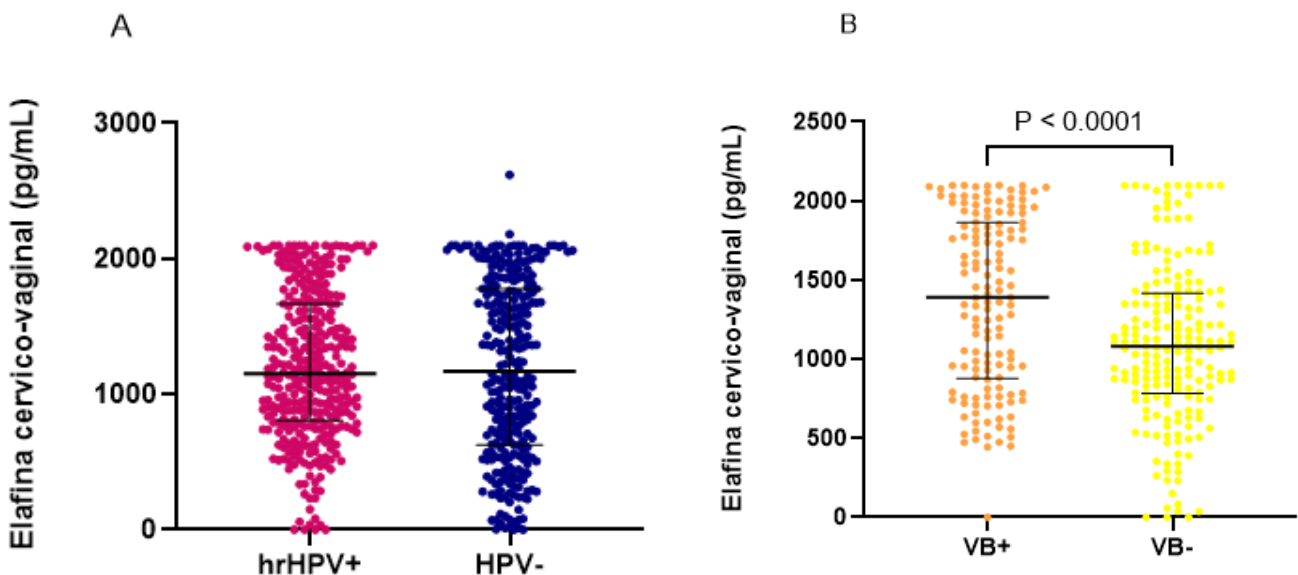
hrHPV, 158 foram positivas para VB e 246 negativas. Em relação às hrHPV-negativas (n= 1095), 314 apresentaram VB e 773 foram negativas para esta alteração de microbiota vaginal.

A comparação da quantificação de elafina entre os grupos com infecção pelo hrHPV e ausência de infecção, independentemente do padrão de microbiota vaginal, encontra-se representada na Figura 2A. Pode-se notar que os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa, com mediana de 1.164 pg/mL para as amostras hrHPV-positivas, quando comparado ao grupo que não apresentava a infecção viral (1.169 pg/mL).

De acordo com a Figura 2B, dentre as amostras com infecção por hrHPV, aquelas com VB apresentaram concentrações significativamente maiores de elafina cérvico-vaginal (1.390 pg/mL) em comparação com as amostras classificadas com microbiota normal (1.079 pg/mL), sendo $p < 0,000$.

Conforme pode ser observado na Figura 2C, no grupo de amostras sem infecção pelo hrHPV, a ausência de VB culminou em níveis estatisticamente elevados de elafina (1.594 pg/mL) em relação ao grupo com VB (904 pg/mL), sendo $p < 0,0001$.

Encontra-se representado na Figura 3A a comparação de elafina em mulheres com VB em relação à presença ou ausência de hrHPV. Foi possível identificar que mulheres hrHPV-positivas apresentaram maiores níveis desse mediador. Já na Figura 3B, é possível identificar que, na presença de uma microbiota com predomínio de *Lactobacillus* spp. (ausência de VB), participantes hrHPV-positivas apresentaram valores significativamente inferiores de elafina em relação àquelas com resultados negativos para o vírus.



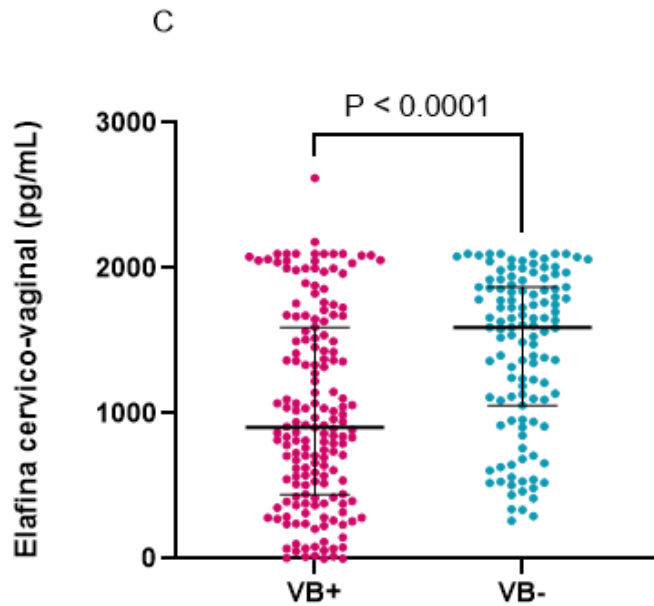


Figura 2. Quantificação de elafina cérvico-vaginal (pg/mL) de acordo com **A)** o status da infecção pelo hrHPV, sendo que pacientes com lrHPV foram excluídas da análise, **B)** em participantes hrHPV+ de acordo com o status da presença de VB e **C)** Quantificação de elafina cérvico-vaginal (pg/mL) em participantes HPV- de acordo com classificação de microbiota vaginal. As barras horizontais indicam mediana e intervalo interquartil. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney.

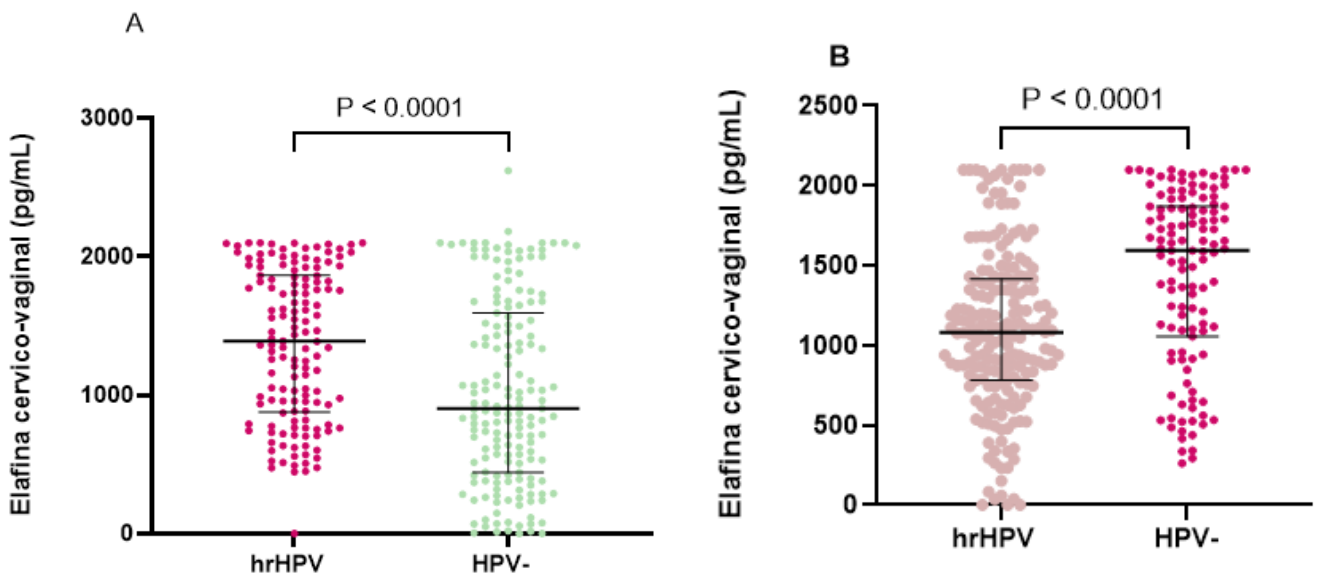


Figura 3. Comparação dos níveis de elafina cérvico-vaginal (pg/mL) em participantes com presença (A) e ausência (B) de vaginose bacteriana (VB), respectivamente, de acordo com status do HPV. As barras horizontais indicam mediana e intervalo interquartílico. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney.

Além disso, foram realizadas análises estatísticas para comparação dos níveis cérvico-vaginais de elafina em relação à presença de lesão em M1, de acordo com exame de citologia do material. Os resultados encontrados foram: 263 pacientes sem alteração, 11 LSIL (Lesão Intraepitelial de Baixo Grau), 6 HSIL (Lesão Intraepitelial de Alto Grau) e 8 ASCUS (Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo $p < 0,0001$, conforme demonstrado na Figura 4.

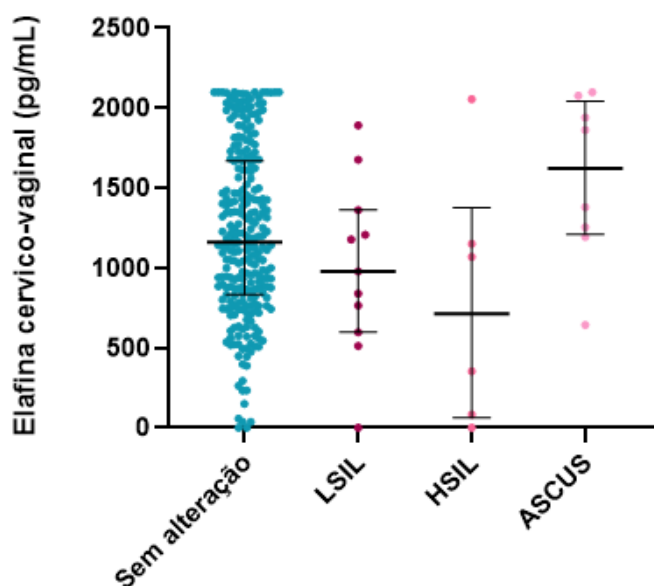


Figura 4. Comparação dos níveis de elafina cérvico-vaginal (pg/mL) de acordo com a presença de lesão em M1. As barras horizontais indicam mediana e intervalo interquartílico. Dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

As amostras que apresentaram positividade para hrHPV em M1 foram submetidas à seguimento do estudo (M2) no período médio de 12 meses. A partir disso, foram realizadas análises qualitativas em relação ao desfecho do hrHPV em comparação aos genótipos identificados, conforme demonstrado na Figura 5. Frente à isso, foi possível identificar que 114 (40%) pacientes evoluíram para o *clearance* da infecção, 84 (29%) apresentaram persistência da infecção, 22 apresentaram persistência e incidência de um novo genótipo (8%), 21 (7%) apresentaram persistência e *clearance* de determinados genótipos, 26 (9%) realizaram o *clearance* e manifestaram a incidência de uma nova infecção e, por fim, 21 (7%)

pacientes passaram pelos 3 processos (*clearance* de um genótipo, persistência de outro e incidência de um novo em M2). Em seguida, foram incluídas no grupo “Persistência” aquelas que apresentaram persistência de, no mínimo, algum genótipo e aquelas que apresentaram os 3 desfechos diferentes, resultando em 148 participantes. Já para o grupo “*clearance*” foram incluídas as que apresentaram resolução da infecção propriamente dita e aquelas que apresentaram *clearance* e incidência de um novo genótipo, resultando em 140 pacientes. Houve uma perda de seguimento de 48 pacientes, portanto, não foram incluídas nas análises.

As amostras foram submetidas a análises estatísticas para comparação dos níveis cérvico-vaginais de elafina em relação aos desfechos de *clearance* e persistência do hrHPV. O grupo *clearance* apresentou uma mediana de 1.128 pg/mL, enquanto o grupo persistência apresentou 1.260 pg/mL. Não houve diferença estatisticamente significativa entre ambos, sendo $p < 0,0001$, conforme demonstrado na Figura 6.

Além disso, foram realizadas análises estatísticas para comparação dos níveis cérvico-vaginais de elafina de mulheres hrHPV-positivas apresentados no momento da inclusão no estudo em relação à constituição da microbiota vaginal nos dois momentos. Os níveis do peptídeo apresentaram-se elevados no grupo que desenvolveu cura da disbiose vaginal (1.352 pg/mL) em relação ao grupo que manteve a eubiose (1.094 pg/mL), com $p = 0,0114$. Também foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0202$) entre as amostras que apresentaram persistência da VB (1.399 pg/mL) e aquelas que mantiveram a eubiose vaginal (1.094 pg/mL), conforme Figura 7. Houve perda de 8 pacientes que não apresentaram classificação de microbiota em M2.

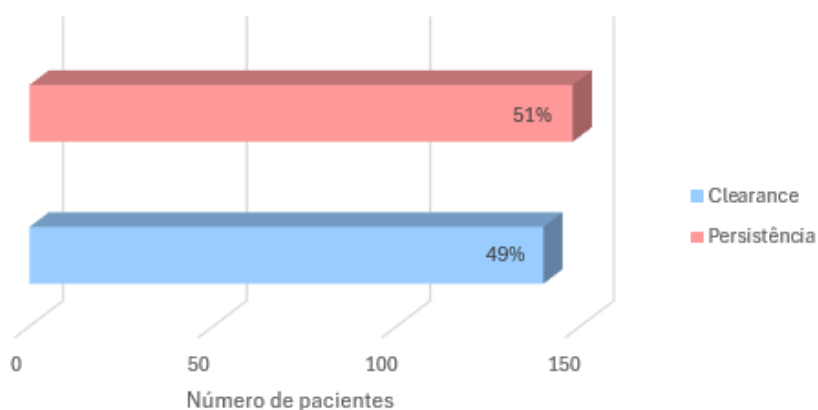


Figura 5. Distribuição percentual dos diferentes desfechos de infecção por hrHPV diagnosticado no momento da inclusão do estudo em relação ao período médio de 12 meses do *follow up* (M2).

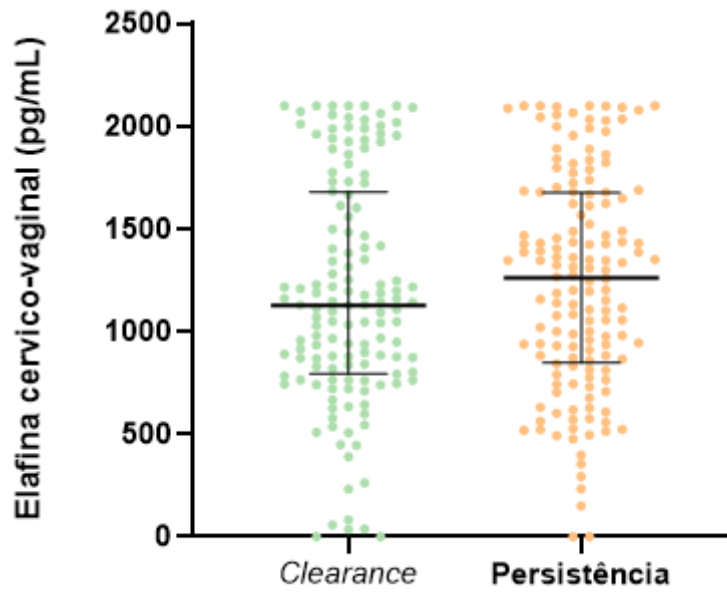


Figura 6. Quantificação de elafina cérvico-vaginal (pg/mL) de acordo com o desfecho da infecção pelo hrHPV no *follow up*. As barras horizontais indicam mediana e intervalo interquartílico. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney.

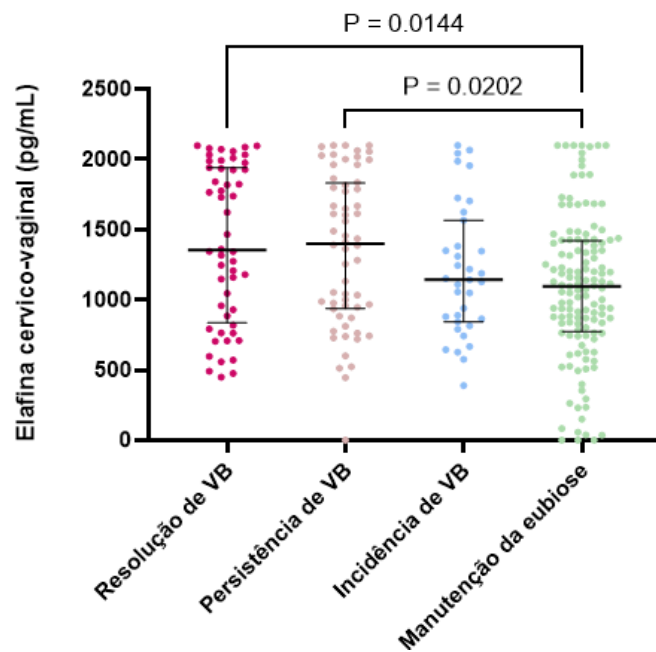


Figura 7. Quantificação de elafina cérvico-vaginal (pg/mL) de acordo com a evolução da constituição da microbiota vaginal. As barras horizontais indicam mediana e intervalo interquartílico. Dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

6. Discussão

O presente estudo contribuiu para a melhor compreensão do papel da elafina frente a infecção pelo hrHPV e sua relação com a microbiota vaginal em mulheres em idade reprodutiva. Os resultados demonstram concentrações significativamente maiores dessa proteína em mulheres com infecção pelo hrHPV e VB, quando comparadas àquelas com microbiota normal. Em contrapartida, em mulheres hrHPV-negativas, os níveis de elafina foram mais elevados nas participantes com microbiota normal em relação àquelas com VB. Esses achados sugerem que a elafina pode ter envolvimento na resposta imunológica local frente às alterações da microbiota vaginal.

A elafina e seu precursor Trappin/2 são mediadores com sequências peptídicas muito semelhantes, capazes de controlar proteólise tecidual excessiva, infiltração de células inflamatórias e invasão microbiana²². A elafina consiste em um peptídeo antimicrobiano com propriedades anti-inflamatórias, capaz de modular a resposta imune inata e assim, manter a integridade do epitélio vaginal. Sua expressão é usualmente reconhecida como um marcador de processos inflamatórios teciduais. Suas propriedades antimicrobianas já foram estudadas em modelos *in vitro*, demonstrando eficácia contra diversas espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*^{15,22}. Na literatura, o papel da elafina no microambiente vaginal é escassa, mas a principal hipótese sobre a ação dessa proteína reside em sua capacidade de inibir serinoproteases extracelulares, impedindo assim a degradação de componentes da matriz extracelular e a ativação de receptores envolvidos na resposta imune, como receptores do tipo *Toll-Like-4* (TLR-4) e receptores ativados por proteases (PAR). No entanto, ainda há debate se essa interação leva à ativação ou à supressão da resposta celular, o que destaca a complexidade do seu papel na homeostase da mucosa vaginal²³.

A expressão da elafina pode ser regulada por processos inflamatórios e infecciosos, tanto por infecções bacterianas quanto virais^{14,19,20}. Lebeau et al. (2022)¹² relataram que a oncoproteína E7 do HPV é capaz de interagir com vias de sinalização imunológica, reduzindo a expressão de peptídeos antimicrobianos, incluindo a elafina, o que pode favorecer alterações na microbiota vaginal e predispor a ocorrência de VB. Em nosso estudo, os níveis de elafina não diferiram significativamente entre os grupos hrHPV-positivo e hrHPV-negativo quando o status da microbiota vaginal não foi considerado. Esse resultado contrasta com estudos que demonstraram uma regulação negativa da elafina em resposta ao HPV, como o trabalho de

Duffy, Phillips e Klingelutz (2003)¹⁶ que mostrou que a oncoproteína E6 do HPV16 pode inibir a expressão de genes envolvidos na resposta imunológica. Uma possível explicação para essa discrepância pode estar relacionada à variabilidade individual na resposta imune, ao tempo de infecção ou à presença de diferentes genótipos de HPV na população estudada.

A associação entre VB e HPV já foi amplamente documentada na literatura, sendo descrita como um fator de risco para a persistência viral e redução das taxas de *clearance* do HPV. Achados de Belletti et al.¹¹ demonstraram que a presença de *Gardnerella vaginalis* está correlacionada com uma menor taxa de eliminação do HPV, possivelmente devido à formação de biofilmes que dificultam a resposta imune do hospedeiro. Nossos achados corroboram essa hipótese, uma vez que a elafina, conhecida por sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, apresentou concentrações mais elevadas no grupo hrHPV na presença VB, sugerindo uma possível tentativa do sistema imune em combater essa disbiose.

De acordo com nossos resultados, em cenário sem o genótipo viral, mulheres com uma microbiota saudável apresentam níveis elevados do peptídeo em comparação àquelas que manifestam a VB. Além disso, não foi observada diferença significativa nos níveis de elafina em relação à presença de lesão cervical, o que sugere que sua concentração pode estar mais relacionada à dinâmica da microbiota cérvico-vaginal. Na literatura, estudos analisando as concentrações de elafina e seu papel na microbiota de mulheres não infectadas pelo HPV são escassos. Corroborando com os nossos achados, Matsuda et al. (2023)¹⁷ observou níveis aumentados de elafina por ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de sobrenadante de cultura de células do epitélio cervical de gestantes frente à presença de *G. vaginalis*, quando comparado à composição da microbiota classificada como normal, indicando que a presença de *G. vaginalis* estimula a produção e liberação do peptídeo. Esses achados foram encontrados em mulheres sem HPV, porém durante a gestação. Em contrapartida, Jespers et al. (2017)¹⁸, ao estudar mulheres que apresentavam VB, identificou concentrações reduzidas de elafina em amostras de conteúdo cérvico-vaginal por ELISA, quando comparado à mulheres com microbiota saudável.

Quanto às análises em relação ao desfecho do hrHPV, as concentrações proteicas não apresentam diferença estatisticamente significativa. Entretanto, quando analisada a evolução da composição da microbiota vaginal, pacientes que alcançaram a resolução ou persistência da VB apresentaram níveis elevados do peptídeo em comparação àquelas que mantiveram a eubiose vaginal durante o período. Dessa forma, nossos resultados mostraram que a elafina

pode estar envolvida na modulação da resposta imune local, sofrendo influência da composição da microbiota vaginal.

Lebeau et al. (2022)¹² relatou, por meio de técnicas de imunohistoquímica e expressão gênica em amostras de tecido vaginal de camundongos transgênicos K14-HPV16, que a oncoproteína E7 do HPV interage com componentes das vias de sinalização NF- κ B e Wnt/ β -catenina, resultando na inibição da expressão de peptídeos de defesa, como a elafina. A redução desses peptídeos demonstrou influência na interação entre o hospedeiro e a microbiota vaginal, contribuindo para a disbiose observada durante a infecção pelo HPV. Estes resultados confrontam nossos achados em relação à presença do hrHPV, já que não identificamos alterações nos níveis do peptídeo de acordo apenas com a infecção viral quando desconsiderado o cenário da disbiose vaginal.

Nesse mesmo estudo¹², apesar da elafina apresentar propriedades antimicrobianas, a alta concentração por queratinócitos vaginais e cervicais não atua de forma negativa contra os *Lactobacillus* spp.. Esses peptídeos foram clivados por proteases e usados como fontes de aminoácidos, colaborando com a manutenção da microbiota vaginal. Em nossos achados, foi possível observar a alta concentração de elafina em cenários de eubiose vaginal, o que vai de encontro com a manutenção da microbiota vaginal. Em contrapartida, o estudo¹² afirma que a presença de infecção por HPV é fator determinante para queda dos níveis do peptídeo, o que não foi comprovado pelos nossos resultados.

Uma possível explicação para as diferenças na regulação da elafina frente a infecções virais e bacterianas é que as vias de ativação desse peptídeo podem ser distintas dependendo do tipo de patógeno envolvido. Assim, enquanto infecções bacterianas podem estimular a produção de elafina como um mecanismo de defesa, infecções virais podem induzir a supressão desse peptídeo como estratégia de evasão imunológica.

O estudo em questão apresenta por limitação a perda de seguimento de 201 mulheres. Em suma, nossos achados sugerem que a elafina pode ter um papel relevante na composição da microbiota vaginal. A relação entre elafina, VB e HPV ainda carece de mais estudos, especialmente para entender seus mecanismos moleculares e potenciais aplicações clínicas. Nossos achados ampliam a compreensão sobre os mecanismos de defesa na região cervico-vaginal, sugerindo que a elafina pode ter um papel crucial na composição da microbiota vaginal frente à presença ou ausência do hrHPV. Contudo, mais estudos são

necessários para explorar em detalhes os mecanismos moleculares que governam essa interação, bem como o impacto da presença de VB sobre a dinâmica da infecção pelo hrHPV e a progressão para o *clearance*.

7. Conclusão

Este estudo evidenciou que os níveis de elafina cérvico-vaginal estão significativamente elevados em mulheres com infecção por HPV de alto risco quando na presença de VB. Esses achados sugerem que a elafina está envolvida na modulação da resposta imunológica local, o que poderia influenciar o curso da infecção pelo HPV e a composição da microbiota vaginal. Embora a alta expressão de elafina possa representar uma resposta inflamatória ao HPV, a interação complexa com a microbiota e sua contribuição para o desenvolvimento de disbioses requerem investigação adicional. Esses resultados ampliam a compreensão sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na interface HPV-microbiota, destacando a elafina como um potencial marcador de status da microbiota frente à infecção viral.

8. Considerações finais

O presente estudo apresentou achados importantes sobre as alterações de quantificação de elafina/trappin-2 na região cérvico-vaginal de acordo com status de infecção por HPV e composição da microbiota vaginal, especialmente durante a vaginose bacteriana, considerada a disbiose vaginal mais comum em mulheres em idade reprodutiva. A compreensão da relação HPV-microbiota ainda é pouco elucidada e nossos resultados contribuem para maiores entendimentos do tema, tendo em vista a elafina como um possível mediador dessa complexa interação. É de extrema importância maiores estudos acerca do curso da infecção pelo HPV, visando maiores esclarecimentos sobre essa relevante questão de saúde pública que é o câncer do colo de útero.

REFERÊNCIAS

1. BERNARD, Hu. et al. **Classification of papillomavirus based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.** *Virology*, 2010. 401(1):70-9. Disponível em: doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002
2. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **HPV.** Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/aceso-a-informacao/perguntas-frequentes/hpv>
3. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Fatores de Risco - Informações sobre os fatores de risco para Câncer do Colo do Útero.** Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/fatores-de-risco>
4. INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. **Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies.** *Int J Cancer*, 2006. 119(5):1108-24. Disponível em: doi: 10.1002/ijc.21953.
5. RAVEL, J., et al. **Vaginal microbiome of reproductive-age women.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108 Suppl 1(Suppl 1):4680-7. Disponível em: doi: 10.1073/pnas.1002611107.
6. MARCONI, C. et al. **Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in southeastern Brazil.** *Int J Gynaecol Obstet*, 2015. 131(2): 137-41. Disponível em: doi: 10.1016/j.ijgo.2015.05.016.
7. LEWIS, F.M.T.; BERNSTEIN, K.T.; ARAL, S.O. **Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases.** *Obstet Gynecol*, 2017. 129: 643–54. Disponível em: doi: 10.1097/AOG.0000000000001932.
8. RAVEL, J. et al. **Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis.** *Microbiome*, 2013. 1(1):29. Disponível em: doi: 10.1186/2049-2618-1-29.

9. KING, CC. et al. **Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus.** Infect Dis Obstet Gynecol, 2011. 2011: 319460. Disponível em: doi: 10.1155/2011/319460
10. GILLET, E. et al. **Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis.** BMC Infect Dis, 2011. 11: 10. Disponível em: doi: 10.1186/1471-2334-11-10.
11. BELLETI, R. et al. **Cervicovaginal loads of Gardnerella spp. are increased in immunocompetent women with persistent high-risk human papillomavirus infection.** Journal of Medical Microbiology, 2022. 71:001527. Disponível em: DOI 10.1099/jmm.0.001527
12. LEBEAU, A. et al. **HPV infection alters vaginal microbiome through down-regulating host mucosal innate peptides used by *Lactobacilli* as amino acid sources.** Nature Communications, 2022. 13: 1076. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28724-8>
13. BOUCHARD, D. et al. **Proteins with whey-acidicprotein motifs and cancer.** Lancet Oncol, 2006. 7(2): 167. Disponível em: doi: 10.1016/S1470-2045(06)70579-4.
14. DRANNIK, A.G. et al. **Antiviral activity of trappin-2 and elafin in vitro and in vivo against genital herpes.** J Virol, 2013. 87(13): 7526. Disponível em: doi: 10.1128/JVI.02243-12.
15. PFUNDT, R. et al. **Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia.** J Clin Invest, 1996. 98(6): 1389. Disponível em: doi: 10.1172/JCI118926.
16. DUFFY, C.L. et al. **Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6.** Virology, 2003. 314(1): 196. Disponível em: doi: 10.1016/s0042-6822(03)00390-8
17. MATSUDA, S. et al. **Pathological roles of antimicrobial peptides and pro-inflammatory factors secreted from the cervical epithelium in Gardnerella vaginalis-abundant vaginal flora in pregnancy.** J Reprod Immunol, 2023 Mar:156:103797. Disponível em: doi: 10.1016/j.jri.2023.103797.

18. JESPERS, V. et al. **A longitudinal analysis of the vaginal microbiota and vaginal immune mediators in women from sub-Saharan Africa.** *Sci Rep*, 2017. 7(1):11974. Disponível em: doi: 10.1038/s41598-017-12198-6.
19. MCMICHAEL, J.W. et al. **The antimicrobial antiprotease elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses.** *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32(5): 443. Disponível em: doi: 10.1165/rcmb.2004-0250OC
20. QI, L. et al. **The role of recombinant human elafin in the resistance of A549 cells against pseudomonas aeruginosa biofilm.** *Respiration*. 2010; 79(1): 68–75. Disponível em: doi: 10.1159/000218154.
21. MARCONI, C. et al. **Cervicovaginal levels of proinflammatory cytokines are increased during chlamydial infection in bacterial vaginosis but not in lactobacilli-dominated flora.** *J Low Genit Tract Dis*. 2014 Jul;18(3):261-5. Disponível em: doi: 10.1097/LGT.0000000000000003.
22. DERAISON, C, et al. **Elafin and its precursor trappin-2: What is their therapeutic potential for intestinal diseases?** *Br J Pharmacol*. 2023 Jan;180(2):144-160. Disponível em: doi: 10.1111/bph.15985.
23. SALLENAVE, J.M. **Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity.** *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Jun;42(6):635-43. Disponível em: doi: 10.1165/rcmb.2010-0095RT.

ANEXO A - Parecer do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação dos níveis cervico-vaginais de elafina e S100A7 de acordo com o status de infecção pelo HPV e presença de vaginose bacteriana

Pesquisador: Camila Marcon

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71540823.1.0000.5411

Instituição Proponente: Unidade de Pesquisa Experimental

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.259.511

Apresentação do Projeto:

As informações descritas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas dos documentos e arquivo - Informações Básicas da Pesquisa com data de 15/08/2023.

Introdução: Introdução: Os papilomavirus humanos (HPVs) são vírus capazes de infectar pele e mucosas do corpo humano, causando infecções que variam desde assintomáticas até causadoras de lesões neoplásicas. São vírus não envelopados, tendo o capsídeo viral formado pelas proteínas L1 e L2. Os HPVs possuem genes que codificam seis proteínas nomeadas precoces (E1, E2, E4, E5, E6, E7) e duas proteínas tardias (L1, L2). Há mais de 200 tipos de HPVs descritos, sendo que, em torno de 20 podem infectar o trato anogenital. São classificados em dois sub-grupos de acordo com seu potencial oncogênico. As infecções acometem regiões como vulva, vagina, ânus e pênis. Nesses locais, a infecção pelo HPV se associa a diversos tipos de cânceres, especialmente o câncer de colo de útero, considerado um importante problema de saúde pública. A maioria das mulheres que contrai a infecção pelo HPV elimina o vírus dentro de 1 a 2 anos, sem maiores problemas. Entretanto, alguns fatores podem influenciar no curso da infecção, como idade, uso de contraceptivos hormonais, multiplicidade de parceiros e microbiota vaginal. A composição da microbiota vaginal considerada normal se baseia no pre-domínio de espécies de Lactobacillus. O desequilíbrio de microbiota mais comum entre mulheres em idade reprodutiva é a vaginose bacteriana (VB), caracterizada pela substituição dos Lactobacillus por uma grande diversidade de

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

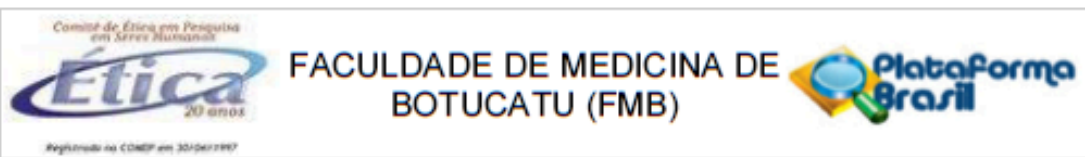
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 6.259.511

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 24 de Agosto de 2023

Assinado por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br

Página 03 de 03